

## Summary

The comparative study has been made of the reaction of diploid and polyploid forms on colchicine. Diploid and artificially induced tetraploid forms of rye as well as different species of wheat — the natural polyploid row ( $2n = 14$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 42$ ) — have been studied. It has been found that artificially obtained polyploid forms demonstrate more significant reaction on colchicine, and thus more significant "polyploid" specificity than the species of the natural polyploid row. It is possible that the difference is due to the long-time action of natural selection for the species of natural polyploid row and due to some changes in their genomes which resulted in uniform reaction of the species on changes in environment.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бреславец Л. П. 1960. В кн.: Физико-химические и структурные основы биологических явлений. М., Изд. АН СССР.
- Зосимович В. П., М. К. Сафин, В. Е. Демченко. 1966. Тр. МОИП, 23: 306—310.
- Изможеров Н. А., Е. Л. Изможорова. 1965. Тр. совещ. по полиплоидии, 14—18 января 1963 г. М.—Л., «Наука»: 178—181.
- Мансурова В. В., В. В. Сахаров, В. В. Хвостова. 1957. Делег. съезд Всесоюз. бот. о-ва. Тез. докл., 1: 19—21.
- Навашин М. С. 1951. Тр. Бот. ин-та АН СССР, сер. VII, 2. М.—Л., Изд. АН СССР: 268—293.
- Сахаров В. В., В. В. Мансурова, Р. И. Платонова, В. К. Щербаков. 1960. Цитологические доказательства физиологической защищенности аутотетраплоидов гречихи (*Fagopyron esculentum* Moench) от действия ионизирующей радиации. М., Изд. АН СССР.
- Тицу Х. 1965. Автореф. канд. дисс. Изд. ЛГУ.
- Уткин И. А. 1953. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 36: 56—62.
- Conger A., A. Johnston. 1956. Nature, 178, 4527: 271.
- Davidson D. 1965. Ann. Bot., 114: 253.
- Dustin P. 1959. Kinetics of cellular proliferation. Ed. F. Stohlman. N. Y.: 50.
- Vant Hof, H. Sparrow. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 49: 897—901.
- Eigsti O. 1937. Genetics, 32: 85.
- Eigsti O., P. Dustin. 1955. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Yowa State College Press.
- Kostoff D. 1940. Current Science, 9: 277—278.
- Lesly J. 1932. Genetics, 13: 63.
- Levan A. 1936. Hereditas, 22: 278—280.
- Levan A. 1938. Hereditas, 24: 471—486.

## О ПРИРОДЕ СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВОСТИ У ХЛОРЕЛЛЫ

В. В. Тугаринов, Ф. Н. Тхруни, К. В. Квитко

У одноклеточных зеленых водорослей (хламидомонада, хлорелла) удалось выделить два аналогичных типа мутантов, устойчивых к 100 ед/мл и 500 ед/мл стрептомицина (*sr*-100, *sr*-500) (Sager, 1954; Тугаринов, 1965; Квитко, Симаров, 1966). Генетический анализ показал, что эти два типа мутантов у хламидомонады имеют различную природу. Первый тип мутаций (мутации *sr*-100), наследующихся по менделеевской схеме, являются преадаптивными, т. е. для их возникновения не требуется контакта с антибиотиком. Мутации второго типа (*sr*-500), обычно передающиеся при половом размножении всем продуктам мейоза от типа спаривания (+), возникают при непосредственном контакте с антибиотиком. Это характеризует стрептомицин как мутаген для факторов внехромосомной природы (Sager, 1954, 1962; Sager, Tsubo, 1961, 1962).

Детальный флуктуационный анализ (Gillham, Levine, 1962) с проведением четкого контроля подтвердил различие этих типов мутаций.

Однако авторы наряду с признанием факта прямой индукции стрептомицином мутантов *sr-500* придерживаются теории внутриклеточной селекции, позволяющей объяснить возможность большей частоты возникновения устойчивых вариантов в присутствии агента.

Данные флуктуационного теста на хлорелле (Тугаринов 1965; Квитко, Симаров, 1966) свидетельствуют о преадаптивности мутаций *sr-100* и о возникновении мутантов *sr-500* лишь на средах со стрептомицином. Тем самым имеется возможность обсуждать гипотезу гомологии этих факторов у хлореллы и хламидомонады, хотя нам кажется, что метод флуктуационного анализа не может дать полный ответ на вопрос относительно происхождения выделенных форм. По-видимому, он способен лишь вычленить тот превалирующий механизм, который участвует в процессе возникновения устойчивых клеток. Не исключена возможность, что этот процесс совмещает в себе как элемент преадаптации, так и элемент прямой индукции, что, естественно, требует использования комплексного метода, позволяющего выяснить этот вопрос более детально.

Исходя из принципа гомологии структуры генотипа и основываясь на фенотипическом сходстве стрептомицинустойчивых мутантов хлореллы и хламидомонады, мы приняли за исходный постулат полигенность признака стрептомицинустойчивости у хлореллы. Появление стрептомицинустойчивых мутантов на средах с высокой концентрацией (500 ед/мл) мы представляем себе как результат двух различных событий. Единичные клетки с высоким уровнем устойчивости (преадаптивная комбинация мутаций) встречаются очень редко, но начинают сразу же размножаться на среде 500 ед/мл. Наряду с выявлением единичных преадаптивных комбинаций мутаций может осуществляться многоступенчатый отбор мутантов в ходе размножения слабоустойчивых клонов и сопутствующего ему мутагенеза. Колонии мутантов этого типа должны появляться значительно позднее, но число их на пробу будет пропорционально численности слабоустойчивого клона.

В данной работе предпринята попытка дальнейшего изучения роли мутаций и отбора в приобретении устойчивости и взаимосвязи между этими процессами на примере стрептомицинустойчивости хлореллы. Использовались два типа тестирования: 1) флуктуационный анализ устойчивых мутантов с учетом в различные сроки; 2) выявление действия сублетальной дозы антибиотика на чувствительные клетки при последующем флуктуационном анализе.

Исходным материалом служил клон *B. Chlorella vulgaris* Beijer, культивируемый в асептических условиях. Питательной средой являлась минеральная среда с 2% добавками глюкозы и агара (среда ФГА). Выращивание проводилось в темноте, при температуре 30°. Использовался модифицированный тест флуктуации Лурия и Дельбрука на фоне 500 ед/мл. Таким образом, вопрос происхождения устойчивости решался на мутантах типа *sr-500* и выше. Схема эксперимента сводилась к следующему: колонии, выращенные на чашке без стрептомицина, переносились полностью на селективную среду активностью 500 ед/мл. При этом каждый клон распределялся в капле воды на  $\frac{1}{4}$  площади чашки. Среднее число клеток на колонию составляло 3,6—4 млн на пробу. Ошибка выборки определялась высевом проб из одного клона в тех же условиях. Параллельно флуктуационному анализу подвергались клоны с тем же числом клеток и выросшие на среде с нелетальной дозой стрептомицина (20 ед/мл). Используемая доза уменьшала эффективность клонирования на 20%. Этот вариант эксперимента ставился с целью выяснения воз-

можной роли малой дозы как слабо селективирующего, заведомо не мутагенного фактора в приобретении устойчивости к 500 ед/мл антибиотика. Учет устойчивых вариантов в обоих экспериментах проводился дважды — через 10 и 30 суток.

В дальнейшем схема эксперимента была модифицирована: готовилась суспензия клеток в полужидком агаре с концентрацией антибиотика 500 ед/мл, после чего производился засев на плотный агар при той же дозе в среде (7 повторностей). Это обеспечивало более равномерное распределение клеток в агаре. Значения дисперсии и сред-

Таблица 1

Варьирование числа *sr*-500 мутантов в колониях, выросших на среде с 20 ед/мл стрептомицина и без него (число клеток в колонии 3.6—4.10<sup>6</sup>)

Доза, ед/мл	Показатели	Учет на 10-е сутки					Учет на 30-е сутки				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	$\bar{x}$	0,06	0,34	1,37	0,31	0,16	0,06	0,86	1,65	0,42	0,18
	$\sigma^2$	0,09	0,69	3,68	1,23	0,11	0,09	1,36	3,57	1,44	0,15
20	$\bar{x}$	0,62	0,27	1,43	0,75	0,56	0,72	1,82	2,64	2,02	2,61
	$\sigma^2$	3,67	0,67	4,22	3,24	1,16	3,77	2,19	8,11	8,57	23,73

Примечание. 1—5 — повторности.

Таблица 2

Увеличение числа *sr*-500 мутантов в потомстве отдельных колоний, предварительно выращенных на среде с 20 ед/мл стрептомицина и без него

Число мутантов в колонии	Колонии с соответствующим числом мутантов			
	0 ед/мл		20 ед/мл	
	10 суток	30 суток	10 суток	30 суток
0	256	191	244	133
1—2	58	67	73	71
3—8	19	21	32	66
9—32	1	2	3	15
33—128	0	0	0	0
Всего . . .	334	281	352	285

него арифметического в этих контрольных опытах составляли соответственно: 0 ед/мл —  $\bar{x}=17,66$ ;  $\sigma^2=69,91$ ; 20 ед/мл —  $\bar{x}=16,87$ ;  $\sigma^2=52,78$ .

Учет остаточного роста проводился под микроскопом МБИ-3 при увеличении 8×20, перераспределение клеток колоний на 2-й и 4-й день инкубации проводилось шпательем с добавлением 0,1 мл воды.

В нашем предыдущем сообщении указывалось, что тип мутантов *sr*-500 индуцируется стрептомицином с частотой 0,001% (Тугаринов, 1965). В дальнейших экспериментах обнаружилось, что частота устойчивых вариантов, отбираемых на 500 ед/мл, может варьировать в зависимости от момента их учета. Установлено, что при учете частоты устойчивых форм на 10-е сутки для обоих вариантов значение дисперсии близко к средней величине, что соответствует пуассоновскому распределению (табл. 1 и 2).

При учете числа *sr*-500 мутантов на 30-е сутки культивирования в пе-

Таблица 3

Варьирование числа *sr*-500 мутантов в колониях, выросших на среде с 20 ед/мл стрептомицина и без него (тестирование суспензии клеток в полужидком агаре)

Доза, ед/мл	Показатели	Повторность						
		1	2	3	4	5	6	7
0	<i>N</i> (число клеток)	1·10 <sup>6</sup>	1·10 <sup>6</sup>	6,2·10 <sup>6</sup>	12,5·10 <sup>6</sup>	—	9,8·10 <sup>6</sup>	—
	$\bar{x}$	1,85	4,69	8,64	4,60	—	5,58	11,40
	$\pm 2$	5,86	16,36	809,81	25,99	—	24,53	21,70
20	<i>N</i>	1·10 <sup>6</sup>	1·10 <sup>6</sup>	58·10 <sup>6</sup>	12,5·10 <sup>6</sup>	62,5·10 <sup>6</sup>	11,2·10 <sup>6</sup>	—
	$\bar{x}$	10,53	1,64	83,02	20,30	33,88	12,44	58,31
	$\sigma^2$	250,38	3,79	35183,20	2739,61	24611,83	241,65	596,79

которых повторностях (2,5) был обнаружен клоновый эффект, обусловленный предварительным выращиванием на 20 ед/мл антибиотика. В этих случаях значение дисперсии составляло величину на порядок выше значения средней величины. Подобная картина не наблюдалась при использовании клонов, не прошедших предварительной обработки антибиотиком, хотя число устойчивых мутантов на одну колонию увеличивается ко второму сроку учета.

Для того чтобы понять этот эффект, были предприняты два рода экспериментов: учет остаточного роста клеток на среде с 500 ед/мл стрептомицина и перераспределение клеток на чашке через двое и четверо суток контакта с антибиотиком. Около 50% чувствительных клеток делится за первые сутки на среде со стрептомицином, давая две или четыре дочерние клетки. Далее (на 2-е сутки) деление основной массы клеток не наблюдается. Вместе с тем перераспределение клеток выявляет 8-, 16-кратное увеличение числа устойчивых мутантов через двое суток, что соответствует 2—3 удвоениям одной исходной клетки. Через четверо суток наблюдается от 7 до 12 удвоений в единичных пробах и увеличивается число проб, в которых выявляется по 2—3 удвоения устойчивых клеток. Это доказывает, что в тестируемой совокупности имеется небольшое количество клеток, начинающих размножаться в течение первых суток и значительно большее число клеток, приступающих к делению на 4-е сутки. Встречаемость клеток, способных размножаться на стрептомицине с этой дозой, — одна на миллион или даже меньше.

В эксперименте с использованием полужидкого агара тестировались чувствительные колонии более крупных размеров. Показано, что выращивание на среде с нелетальной дозой стрептомицина увеличивает клоновый эффект. При этом значение дисперсии на 1—3 порядка выше значения средней величины (табл. 3 и 4).

Таблица 4

Увеличение числа *sr*-500 мутантов в потомстве отдельных колоний, предварительно выращенных на среде с 20 ед/мл стрептомицина и без него (тестирование суспензии клеток в полужидком агаре)

Число мутантов в колонии	3 ед/мл	20 ед/мл
0	19	15
1—2	52	34
3—8	64	66
9—32	37	73
33—128	1	18
129—512	1	8
>512	0	4
Всего . . . . .	174	218

Примечательно, что в одной из повторностей (3) был обнаружен клонный эффект в варианте опыта без предварительной обработки стрептомицином. То обстоятельство, что в общей выборке из 508 тестируемых колоний этого типа были выявлены лишь две с явными клонами устойчивых мутантов (более 32 мутантов на колонию), свидетельствует о малой величине вероятности существования в популяции преадаптивного клона, устойчивого к 500 ед/мл (табл. 2 и 4, 0 ед/мл).

Вывод о существовании в колониях чувствительной культуры клонов преадаптивных мутантов и об увеличении вероятности выявления таких клонов после пассажа чувствительных клеток на сублетальной концентрации стрептомицина основывается на данных флукуационно-

Таблица 5

Повторное определение уровня устойчивости в выборках из мутантных клонов

Характеристика пробы устойчивых мутантов	Уровень устойчивости, ед/мл					Стрептомицин-зависимость
	100	100	500	100	1200	
Из одного клона со среды без стрептомицина . . . . .	0	2	18	0	2	0
То же . . . . .	0	0	1	2	19	1
Из одного клона со среды с 20 ед/мл стрептомицина . . . . .	0	22	0	0	1	0
Из разных проб со среды без стрептомицина . . . . .	3	7	19	5	9	0

го теста. В дальнейшем с целью подтверждения единообразия мутантов по анализируемому признаку необходимо было определить их уровень устойчивости. Такое испытание проведено методом репликации суспензий устойчивых клеток на серию сред с концентрацией 100, 500, 750, 1200 ед/мл стрептомицина.

В табл. 5 показано, что в выборках встречаются колонии мутантов разного уровня устойчивости, но основная часть мутантов имеет один и тот же фенотип.

Появление более устойчивых мутантов среди мутантов *sr-100* и *sr-500*, а также появление стрептомицинзависимого мутанта может быть результатом действия стрептомицина на клетки, слабоустойчивые к нему. В этом случае преадаптивной мутацией следует считать мутацию самого слабого уровня, а дальнейшие мутации, усиливающие этот признак, возникают независимо.

В работе представлены результаты флукуационного анализа распределения частот встречаемости мутантов типа *sr-500*. Частота их возникновения зависит от продолжительности контакта чувствительных клеток со стрептомицином. Подобная закономерность была отмечена Р. Сэджер для этого типа мутаций у хламидомонады (Sager, 1962). Ее данные свидетельствуют о том, что этот уровень устойчивости детерминируется внехромосомным фактором и обнаруживает материнский тип наследования. Тем не менее конкретные механизмы возникновения устойчивости и природа этих детерминантов остаются мало изученными. Р. Сэджер (Sager, 1962), Н. Гилкам и Р. Левин (Gillham, Lewin, 1962), основываясь на данных флукуационных анализов, наряду с гипотезой прямой индукции предложили гипотезу

аутрикеточной селекции, которая предполагает наличие определенного числа дискретных единиц в цитоплазме, ответственных за чувствительный фенотип. Каждая из таких единиц способна к спонтанному мутированию и в случае наличия стрептомицина получает селективные преимущества в процессе деления клетки, формирующей в конечном счете клон *sr-500*, фенотип которого полностью выражен. По нашим представлениям, полигенность признака устойчивости (детерминация которого может касаться как ядра, так и цитоплазмы) и возможность ступенчатого отбора на селективной среде также может формировать клоны, устойчивые к данной дозе антибиотика. Такая слабо селективная доза, как 20 *ед/мл*, в наших экспериментах явилась фактором, способствующим увеличению вероятности дальнейшей адаптации к более высоким дозам антибиотика. Существование клонов стрептомицинустойчивых мутантов в колониях, выросших на сублетальных дозах, а также увеличение значения дисперсии при более поздних сроках учета свидетельствует о правотности наших представлений о возможности ступенчатого отбора устойчивых форм разного генотипа и полигенном характере этого признака у хлореллы.

Для хламидомонады показано, что передача признака устойчивости и зависимости к ряду антибиотиков (стрептомицин, неамин, канамидин и спектиномицин) осуществляется через одного родителя (*mt<sup>+</sup>*). Более того, для некоторых из этих антибиотиков обнаруживается перекрестная устойчивость или зависимость (Gillham, 1969). Интересно, что приобретение устойчивости к стрептомицину в дозе 500 *ед/мл* у этого объекта сопровождается конформационными изменениями хлоропластных 70s рибосом (Gillham et al., 1970). У бактерий устойчивость к этим антибиотикам, в том числе к стрептомицину, также связана с изменениями в аппарате белкового синтеза на рибосомах (Apirion, Schlessinger, 1969). Предполагая, что это положение может оказаться справедливым и для хлореллы, мы должны ожидать высокую степень плеiotропности всех мутаций, связанных со стрептомицинустойчивостью. Из этого следует, что в популяции хлореллы могут появляться лишь небольшие по численности клоны стрептомицинустойчивых мутантов, вследствие неблагоприятного действия мутаций в высокоплейотропных генах на скорость размножения клетки. Слабые дозы ингибиторов могут увеличивать относительную скорость размножения мутантов и способствовать их накоплению в популяции.

Феномен отбора преадаптивных мутантов слабыми дозами ингибитора может представлять собой удобную модель для изучения популяционных процессов в ходе адаптации к ингибитору. Осуществление подобных экспериментов на хламидомонаде, имеющей фенотипически аналогичные типы мутантов, позволит полнее охарактеризовать степень полигенности устойчивости к стрептомицину и вскрыть динамику формирования этого адаптивного признака.

### Выводы

1. Культивирование чувствительных к стрептомицину клеток на слабо селектирующей дозе (20 *ед/мл*) привело к выявлению преадаптивных клонов, устойчивых к 500 *ед/мл*.
2. Анализ чувствительных клонов большой численности позволил выявить редкие случаи преадаптации к стрептомицину у хлореллы.
3. Гетерогенность клонов устойчивых мутантов служит косвенным указанием на многоступенчатость процесса адаптации к стрептомицину.

## Summary

As it was shown in previous publication, the streptomycin resistant to 500 units/ml mutations (*sr*-500) arise in clones of *Chlorella* only on solid media with streptomycin and therefore we regard them as non-preadaptive. Now we try to investigate the nature of *sr*-500 mutations by growing colonies before fluctuation test on a media with low streptomycin concentration and by testing bigger colonies.

Cultivation of sensitive cells (*ss*) of *Chlorella vulgaris* (strain B) on low selecting dose of streptomycin (20 units/ml) led to the discovery of preadaptive clones, resistant to 500 units/ml.

The fluctuation analysis of big clones of sensitive cells can reveal the infrequent cases of preadaptation to streptomycin.

Heterogeneity of clones of resistant mutants is a indirect indication on a multistage process of adaptation to streptomycin.

The adaptation of *Chlorella* cells to streptomycin could be considered as the results of selection and mutations in presence of the inhibitor.

## ЛИТЕРАТУРА

- Квитко К. В., Б. В. Симаров. 1966. Вестник ЛГУ, 15: 110—114.  
Тугаринов В. В. 1965. Вестник ЛГУ, 9: 136—142.  
Apirion D., D. Schlessinger. 1969. Mutation as cellular process. A Ciba Foundation Simp., ed. G. E. Wolstenholme and M. O'Connor. London: 155—167.  
Gillham N. W. 1969. American Naturalist, 103: 932.  
Gillham N. W., R. P. Levine. 1962. Genetics, 47: 1463—1474.  
Gillham N. W., J. E. Boynton, B. Burkholder. 1970. Genetics, (Abstracts), 64: 24.  
Sager R. 1954. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 40: 356—363.  
Sager R. 1962. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2018—2026.  
Sager R., Y. Tsubo. 1961. Zs. Vererbungs., 92: 430—438.  
Sager R., Y. Tsubo. 1962. Archiv für Mikrobiologie, 42: 159—175.